



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 13 204 A 1**

②① Aktenzeichen: 100 13 204.9
②② Anmeldetag: 17. 3. 2000
②③ Offenlegungstag: 11. 10. 2001

⑤ Int. Cl.⁷:
C 07 H 21/04
C 12 N 15/65
C 12 N 15/12
C 12 Q 1/68
C 12 N 5/10

DE 100 13 204 A 1

⑦① Anmelder:
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

⑦② Vertreter:
Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea
Schüßler, 81825 München

⑦③ Erfinder:
Knoch, Tobias, 68239 Mannheim, DE; Waldeck,
Waldemar, 69514 Laudenbach, DE; Müller,
Gabriele, 69123 Heidelberg, DE; Alonso, Angel,
69214 Eppelheim, DE; Langowski, Jörg, 69120
Heidelberg, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:
WO 99 35 292 A1
Chem.Abstr.132(2000)204568
(Proc.Natl.Acad.Sci.USA
97(2000)716-721);
Chem.Abstr.131(1999)194895 (DNA Cell Biol. 18
(1999)457-462);
Chem.Abstr.129(1998)14041 (Curr.Biol. 8(1998)377-
385);
Datenbank MEDLINE AN 2000076468 (J.Biol.Chem.
274
(1999)37950-37956);
Datenbank MEDLINE AN 1999439753 (J.Cell.Biol.
147
(1999)13-24);
Datenbank MEDLINE AN 97197980 (Yeast
13(1997)151-
161);

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ DNA-Sequenz und Verfahren zur in vivo-Markierung und Analyse von DNA/Chromatin in Zellen

⑤⑦ Beschrieben wird ein Verfahren zur in vivo-Markierung von DNA/Chromatin-Strukturen in einer Zelle, das dadurch gekennzeichnet ist, daß in der Zelle eine DNA-Sequenz, vorzugsweise in einen Expressionsvektor inseriert, exprimiert wird, die ein ein Histonprotein und ein fluoreszentes Protein umfassendes Fusionsprotein codiert. Beschrieben wird ferner ein Verfahren zur Analyse der DNA-Struktur, Chromatin-Struktur, Kernstruktur, Zellstruktur oder Zelldynamik, Apoptose etc., das auf dieser in vivo-Markierung basiert. In einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das Fusionsprotein noch mit einem "His-Tag" verknüpft, was die einfache Isolierung von Histonproteinen erlaubt.

BEST AVAILABLE COPY

DE 100 13 204 A 1

EXPRESS MAIL LABEL

NO.: EV 480461509 US

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur in vivo-Markierung von DNA/Chromatin-Strukturen in einer Zelle, das dadurch gekennzeichnet ist, daß in der Zelle eine DNA-Sequenz, vorzugsweise in einen Expressionsvektor inseriert, exprimiert wird, die ein ein Histonprotein und ein fluoreszentes Protein umfassendes Fusionsprotein codiert. Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Analyse der DNA-Struktur, Chromatin-Struktur, Kernstruktur, Zellstruktur oder Zelldynamik, Apoptose etc., das auf dieser in vivo-Markierung basiert. In einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das Fusionsprotein noch mit einem "His-Tag" verknüpft, was die einfache Isolierung von Histonproteinen aus Zellen erlaubt. Diese Histonproteine können dann als "gereinigte" Histone verwendet werden. Die Erfindung betrifft weiter eine DNA-Sequenz, die ein Histonprotein und ein fluoreszentes Protein umfassendes Fusionsprotein codiert.

[0002] Für bestimmte Fragestellungen, z. B. die Beurteilung des Zustands von Geweben und Zellen, ist die Markierung und Beobachtung bzw. Dokumentation der DNA/Chromatin-Struktur bzw. DNA/Chromatin-Dynamik in Zellkernen unerlässlich. So wurden bisher für bestimmte Anwendungen beispielsweise Gegenfärbungen von DNA/Chromatin im Zellkern vorgenommen. Dies erlaubt auch die Bestimmung der Lokalisation bestimmter Proteine, Metabolite oder anderer Substanzen. Die in vivo-Markierung von DNA/Chromatin erlaubt darüber hinaus auch noch beispielsweise die Untersuchung von (a) Struktur/Funktionsbeziehungen im Zellkern unter Einwirkung chemischer Substanzen oder physikalischer Einflüsse (z. B. Strahlung oder Hitze), (b) Struktur/Funktionsbeziehungen im Zellkern zwischen verschiedenen Zellzyklusphasen oder verschiedenen Zellarten, (c) Struktur/Funktionsbeziehungen im Zellkern bei der Differenzierung von Zellen, (d) Mitose, (e) Apoptose und (f) Nekrose. Bisher wurden für diese Untersuchungen meistens die Zellen fixiert und im Anschluß daran wurde die DNA markiert bzw. über Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) nachgewiesen. Zu den bisher angewandten Verfahren zählt auch die Markierung der DNA über die Mikroinjektion von Bromdesoxyuridin, wobei keine native Aufnahme über die Zellmembran erfolgt und ein Nachteil dieses Verfahrens auch die kurze Halbwertszeit von Bromdesoxyuridin ist. Untersuchungen der Mitose waren bisher nur mit aufwendigen Mikroskopie- und Bildverarbeitungsverfahren für Metaphasenchromosomen möglich und durchführbar (keine Kondensation und Dekondensation von Chromosomen). Studien der Apoptose und von Nekrose basierten bisher hauptsächlich auf "DNA-Laddering" von Zellkernlysaten, der Anfärbung von fixierten Zellen mit DNA-interkalierenden Farbstoffen, in vitro-Assays mit terminaler Transferase ("Tunneling"), ELISA (Test hinsichtlich der Freisetzung von Histonen) und "Flow Associated Cell Sorting" (FACS) von fixierten Zellen. Zu den Hauptnachteilen der bisher üblichen Untersuchungen, die durch Beobachtung der DNA/Chromatin-Struktur durchgeführt wurden, zählen z. B. die Befunde, daß (a) diese in der Regel nicht in vivo durchgeführt werden können, wobei hinsichtlich der Mitose bisher nur Beobachtungen an Metaphasenchromosomen möglich sind, (b) die Fixierung der Zellen zu starken Strukturänderungen und der Erzeugung einer Reihe von Artefakten führt, (c) der Zeitaufwand (z. B. gegenüber einer morphologischen Begutachtung in vivo am Mikroskop) wesentlich größer ist, (d) die Untersuchungen ohne Zellverbrauch nicht an denselben Zellen fortgesetzt werden können und (e) damit hohe Kosten verbunden sind, da z. B. zusätzliche Substanzen (oder Kits) und gegebenenfalls auch mehr Zellen benötigt werden.

[0003] Somit liegt der vorliegenden Erfindung das technische Problem zugrunde, diese Nachteile der im Stand der Technik angewandten Verfahren zu überkommen, d. h. ein Verfahren zur Markierung (und Beobachtung) bzw. Dokumentation der DNA/Chromatin-Struktur und/oder DNA/Chromatindynamik bereitzustellen, das in vivo-Analysen der vorstehend aufgeführten Probleme erlaubt, nicht zur Erzeugung von Artefakten führt, die Fortsetzung der Untersuchungen ohne Zellverbrauch an denselben Zellen erlaubt und schließlich zu Kosten- und Zeitersparnis führt.

[0004] Die Lösung dieses technischen Problems erfolgt durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen.

[0005] Es wurde überraschenderweise gefunden, daß das vorstehende Problem dadurch gelöst werden kann, daß die Histonproteine des Chromatins mit einem fluoreszenten Protein markiert werden. Dazu werden die Zellen mit einer DNA-Sequenz transfiziert, das ein ein Histonprotein und fluoreszentes Protein umfassendes Fusionsprotein (Histon-XFP) codiert, das in der Zelle exprimiert wird. Nach Transfektion der Zellen mit dieser DNA-Sequenz und dessen Expression wird das Fusionsprotein aufgrund der Tatsache, daß Histone ein Kern-Lokalisationssignal besitzen, wie ein natürliches Histon (ohne Markierung) in den Zellkern transportiert und in das Nukleosom eingebaut. Somit ist das Chromatin (und damit die DNA) über das Histonprotein fluoreszenzmarkiert. Bei der Verwendung von CFP zur Markierung lassen sich mindestens drei weitere spektrale Markierungen (zwei z. B. mit YFP und RFP ebenfalls in vivo exprimiert) zusätzlich durchführen. Die wesentlichen Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens sind darin zu sehen, daß es zum ersten Mal in vivo-Analysen hinsichtlich der vorstehend diskutierten Probleme ermöglicht und es erlaubt, Beobachtungen zur Mitose nicht nur an Metaphase-Chromosomen durchzuführen. Desweiteren kommt es nicht zur Bildung von Artefakten, was z. B. bei der Fixierung von Zellen leicht möglich ist. Durch die Möglichkeit der einfachen morphologischen Begutachtung am Mikroskop (Echtzeit-Analyse) kommt es zum Wegfall aufwendiger Präparationsverfahren, die Untersuchungen können ohne Zellverbrauch an denselben Zellen durchgeführt werden und schließlich kommt es auch zu einer beträchtlichen Kostenersparnis, da keine weiteren Substanzen oder Kits und auch weniger Zellen benötigt werden. Schließlich eignet sich dieses Verfahren auch zur Kontrolle von Gentransfer und Gentherapie-Experimenten. Das Verfahren eignet sich weiterhin zur Kontrolle von Genomtransfer und Zellverschmelzungsexperimenten, wobei die eine Zelllinie/Zelle (die Donor/Geber-Zelllinie/Zelle) das Histonfusionsprotein exprimiert und eine andere Zelllinie/Zelle (die Akzeptor/Empfänger-Zelllinie/Zelle) dies nicht tut. Für einen begrenzten Zeitraum nach dem Genomtransfer oder der Zellverschmelzung lassen sich die vorher getrennten Genome durch die Histonfusionsprotein-Markierung unterscheiden. Dies gilt für jede Zellzyklusphase und insbesondere für die Mitose, oder den Genomtransfer und die Zellverschmelzung während der Mitose.

[0006] Darüber hinaus ist das erfindungsgemäße Verfahren auch zur Markierung, Isolierung und Aufreinigung bestimmter Histone von Nutzen, was z. B. durch das weitere Ankoppeln eines "His-Tag" an das Fusionsprotein erreicht werden kann. Bisher wurden dazu, z. B. zur Beantwortung von Fragen hinsichtlich der Genregulation bzw. der Tran-

skription, des Transports und des Metabolismus von Histonen und für auf FRET, FCS, CLSM und FACS basierenden Analysen, Histone durch unspezifische Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, z. B. über einen Farbstoff-Succinimidylester, der über eine Umesterung und der Ausbildung einer Säureamidbindung kovalent an die NH-Seitengruppe von allen sterisch zugänglichen Lysinen unspezifisch gebunden wird. Eine spezifische Isolierung von Histonen war dabei nur mit hohem experimentellem Aufwand möglich, z. B. über Saccharose-Ultragradienzentrifugation. Die dabei außerdem auftretenden Nachteile waren (a) die unspezifische Markierung der Histone und die unspezifische Zahl der Farbstoffmoleküle bei der Markierung, (b) eine durch die unspezifisch markierten Moleküle fehlende Möglichkeit der genauen Konzentrationskontrolle der Histone und (c) die Notwendigkeit der Markierung der Histone in einem zweiten Schritt nach deren Isolierung. Im Gegensatz dazu wird mit dem erfindungsgemäßen Verfahren folgendes erreicht: (a) Die Markierung der Histone ist spezifisch, (b) die Markierung pro Histonmolekül erfolgt mit genau einem Farbstoffmolekül (an definierter Position), was eine genaue Konzentrationskontrolle/Quantifizierung erlaubt, (c) die Isolierung der Histone ist wesentlich spezifischer und einfacher möglich, d. h. in einem Schritt und somit wesentlich schonender, und (d) die Histon-XFP-Fusionsproteine können nach der Isolierung sofort verwendet werden und müssen nicht aufwendig markiert werden. Somit ergeben sich deutliche Zeit- und Kostenersparnisse.

[0007] Somit betrifft eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur in vivo-Markierung von DNA/Chromatin-Strukturen in einer Zelle, das dadurch gekennzeichnet ist, daß in der gewünschten Zelle eine DNA-Sequenz exprimiert wird, die ein ein Histonprotein und ein fluoreszentes Protein umfassendes Fusionsprotein codiert.

[0008] Verfahren zur Konstruktion der zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens benötigten, das Fusionsprotein codierenden DNA-Sequenz sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise auch in gängigen Standardwerken beschrieben (siehe z. B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Die DNA-Sequenz liegt vorzugsweise auf einem Expressionsvektor inseriert vor, wobei es sich bei dem Expressionsvektor vorzugsweise um ein Plasmid, Cosmid, Virus, Bakteriophagen oder einen anderen in der Gentechnik üblichen Expressionsvektor handelt. Diese Expressionsvektoren können weitere Funktionseinheiten besitzen, die eine Stabilisierung des Expressionsvektors im Wirtsorganismus bewirken.

[0009] Bei dem Histon kann es sich um eines oder mehrere Histonproteine handeln. Diese und die diese codierenden DNA-Sequenzen sind dem Fachmann bekannt. Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Begriffe "Histon", "Histonprotein" und "fluoreszentes Protein" umfassen auch Protocine, die sich gegenüber den natürlichen bzw. ursprünglichen Proteinen durch Deletion(en), Insertion(en), Austausch(e) von Aminosäuren und/oder andere im Stand der Technik bekannte Modifikationen unterscheiden bzw. ein Fragment des ursprünglichen Proteins umfassen, wobei das so veränderte Protein noch im wesentlichen die biologischen Eigenschaften des Histon(protein)s bzw. fluoreszenten Proteins aufweist und in Säugern biologisch aktiv ist. Dazu zählen auch Allelvarianten. Verfahren zur Erzeugung der vorstehenden Änderungen in der Aminosäuresequenz sind dem Fachmann bekannt und in Standardwerken der Molekularbiologie beschrieben, beispielsweise in Sambrook et al., supra. Der Fachmann ist auch in der Lage, zu bestimmen, ob ein so verändertes Protein noch über die ursprünglichen biologischen Eigenschaften verfügt.

[0010] Bei der Konstruktion der das Fusionsprotein codierenden DNA-Sequenz kann die das Histonprotein codierende DNA-Sequenz direkt mit der das fluoreszente Protein codierenden DNA-Sequenz verknüpft werden oder es kann zwischen beide DNA-Sequenzen ein geeigneter DNA-Spacer inseriert werden, was erfindungsgemäß auch bevorzugt ist, da damit sterische Wechselwirkungen und andere Wechselwirkungen, wie z. B. zusätzliche Ladungen, vermieden werden. Bevorzugt hat der Spacer eine Länge von 5–20 Basenpaaren, ganz bevorzugt 7–15 Basenpaare. So hat sich bei Verwendung von mH2A1.2 ein Spacer von 14 Basenpaaren bewährt, während für alle anderen Histonproteine kürzere Spacer, mit z. B. 7 Bp, bevorzugter sind. Die Auswahl der Basen des Spacers unterliegen keiner Beschränkung und können vom Fachmann beliebig ausgewählt werden. Bei der Klonierung in einen Vektor kann beispielsweise die "multiple cloning site" als Spacer zwischen den beiden kodierenden Sequenzen für Histon- und fluoreszentes Protein fungieren.

[0011] Das Histonprotein kann innerhalb des Fusionsproteins vor oder nach dem fluoreszenten Protein lokalisiert sein. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens stellt das fluoreszente Protein den C-terminalen Anteil des Fusionsproteins dar.

[0012] Die das Fusionsprotein codierende DNA-Sequenz kann auch in einen Expressionsvektor inseriert werden. Somit umfaßt die vorliegende Erfindung auch diese DNA-Sequenz enthaltende Expressionsvektoren, wobei die DNA-Sequenz mit einem Promotor funktionell verknüpft ist, der die Expression in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen, vorzugsweise eukaryotischen Zellen, erlaubt. Die Bezeichnung "Vektor" bezieht sich auf ein Plasmid (pUC18, pBR322, pBlueScript etc.), auf ein Virus oder ein anderes geeignetes Vehikel. Solche Vektoren enthalten neben dem Promotor typischerweise einen Replikationsursprung und spezifische Gene, die die phänotypische Selektion einer transformierten Wirtszelle erlauben. Zu den regulatorischen Elementen (Promotoren) für die Expression in Prokaryonten, beispielsweise E. coli, zählen der lac-, trp-Promotor oder T7-Promotor, und für die Expression in Eukaryoten der AOX1- oder GAL1-Promotor in Hefe und der CMV-, SV40-, RVS-40-Promotor, CMV- oder SV40-Enhancer, sensitive bzw. induzierbare Promotoren, Tet-on, Tet-off für die Expression in Säugerzellen. In Frage kommen auch die natürlichen Promotoren, die die Histone steuern. Die Expression kann entweder konstitutiv oder während eines bestimmten Stadiums z. B. hinsichtlich der Zelldifferenzierung, Entwicklung eines Krankheitsstadiums etc. erfolgen. Weitere Beispiele für geeignete Promotoren sind der Metallothionein I- und der Polyhedrin-Promotor. Zu geeigneten Expressionsvektoren für E. coli zählen beispielsweise pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3h, pPro TerE, pPro LarA und pQE-8. Zu den für die Expression in Hefe geeigneten Vektoren zählen pY100 und Ycpad1, für die Expression in Säugerzellen pMSXND, pKCR, pEF-BOS, cDM8, pef, pQBI und pCEV4. Der für eine ausreichende in vivo-Markierung benötigte Zeitraum der Expression der das Fusionsprotein codierenden DNA-Sequenz hängt von verschiedenen Faktoren ab, z. B. der Transfektionseffizienz, dem verwendeten fluoreszenten Protein, dem Vektor, der Promotorstärke etc. ab und kann vom Fachmann leicht bestimmt werden. Die Transfektionseffizienz mit den erfindungsgemäßen Konstrukten und handelsüblichen Transfektionsreagenzien liegt über 85%. Eine transiente Transfektion bringt befriedigende Ergebnisse nach 4 Stunden und ergibt nach 6–8 Stunden schon sehr gute Ergebnisse, stabil wird die Transfektion nach 3–4 Tagen. Die Klonierung einzelner Transfektionsgrade zu Monokulturen erfolgt nach 4 Wochen. Auch ein Einfrieren und Wiederauftauen der Zellen bringt

kein Abschalten, keine Verringerung der Expression der Konstrukte oder gar einen Verlust der Konstrukte.

[0013] Allgemeine, auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren können zur Konstruktion von Expressionsvektoren, welche die das Fusionsprotein codierende DNA-Sequenz und geeignete Kontrollsequenzen enthalten, verwendet werden. Zu diesen Verfahren zählen beispielsweise in vitro-Rekombinationstechniken, synthetische Verfahren, sowie in vivo-Rekombinationsverfahren, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., supra, beschrieben sind. Dem Fachmann sind Verfahren und Bedingungen bekannt um Wirtszellen zu transformieren bzw. zu transfizieren, Transformanten zu selektieren und diese weiterzukultivieren.

[0014] Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können auch mit einer für ein weiteres Protein bzw. Peptid codierenden DNA-Sequenz verknüpft werden. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist diese weitere DNA-Sequenz eine ein "His-Tag" codierende DNA-Sequenz. "His-Tags" codierende DNA-Sequenzen sind dem Fachmann bekannt und sind z. B. bei der Fa. Clontech, Heidelberg erhältlich und diese können entsprechend Standardtechniken mit der das Fusionsprotein codierenden DNA-Sequenzen verknüpft werden. Vorzugsweise liegt der "His-Tag" am C-Terminus des Fusionsproteins.

[0015] Der Fachmann kennt auch geeignete fluoreszente Proteine XFP und die diese codierenden DNA-Sequenzen. Die Abkürzung "XFP" bedeutet fluoreszentes Protein und steht für BFP (Blue Fluorescent Protein; Heim et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 12501-12504), CFP (Cyan Fluorescent Protein; Heim et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 12501-12504), GFP (Green Fluorescent Protein; SWISSPROT:GFP AEQVI:P42212), YFP (Yellow Fluorescent Protein; SWISSPROT:LUXY VIBFI:P21578) oder RFP (Red Fluorescent Protein; Malz, M. V. et al., Nature Biotechnol., 17(10), S. 969-973, 1999).

[0016] Jedes Histonprotein, das über ein Kern-Lokalisationssignal verfügt und in das Chromatingerüst inseriert werden kann, eignet sich für die Konstruktion der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz und für das erfindungsgemäße Verfahren. Bevorzugt stammt das Histonprotein aus Säugetieren, insbesondere Mensch. Geeignet sind beispielsweise solche der Gruppen H1, H2A, mH2A, H2B, H3 und H4, wobei H1.0, H2A.1, mH2A1.2, H2Ba, H3.1 und H4a besonders bevorzugt sind. H1.0 (EMBL-Datenbank M87841), H2A.1 (Genbank X83549), mH2A1.2 (Genbank AF041483), H2Ba (EMBL X57127), H3.1 (EMBL X57128) und H4a (EMBL X600481). Bezüglich mH2A ist anzumerken, daß dieses bevorzugt im inaktiven X-Chromosom vorkommt. Makro H2As stellen somit eine Möglichkeit dar, ein einzelnes Chromosom zu markieren.

[0017] Wie bereits vorstehend erwähnt eignet sich das erfindungsgemäße in vivo-Markierungsverfahren zu einer Reihe von Untersuchungen. Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Analyse der DNA-Struktur, Chromatinstruktur, Kernstruktur, Zellstruktur und/oder Zelldynamik, das dadurch gekennzeichnet ist, daß im Anschluß an das vorstehend beschriebene Markierungsverfahren die markierten Zellen einer Analyse der räumlichen Verteilung der Fluoreszenz unterzogen werden. Dies erlaubt dann z. B. Rückschlüsse auf die Chromatinverteilung im Zellkern, aus der ein entsprechend gebildeter Fachmann (Pathologe) auf Krankheitszustände schließen kann. Geeignete Analyseverfahren sind dem Fachmann bekannt, wobei als Analyseverfahren ein "Fluoreszenz-Energie-Resonanz-Transfer" (FRET), eine "Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)", eine "Konfokale Laser Scanning Mikroskopie" (CLSM), Epifluoreszenz-Mikroskopie oder eine "Flow Associated Cell Sorting"-Analyse (FACS) bevorzugt sind.

[0018] Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich nicht nur z. B. für mikroskopische Aufnahmen der Struktur, also der Dichteverteilung von DNA/Chromatin im Zellkern während der G1-Phase oder Mitose (Zellteilung), sondern unter anderem auch besonders zur Analyse der Apoptose (siehe dazu Beispiel 5), vor allem auch hinsichtlich der unterschiedlichen Apoptosestadien, die auf Veränderungen in der DNA/Chromatin-Struktur basieren, z. B. Rückbildung von Tumoren, Abbau von Gewebe im Organismus, etc. Dabei kann der zeitliche Verlauf der Apoptose direkt in vivo am Mikroskop beobachtet werden. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich dabei aufgrund seiner einfachen Durchführbarkeit auch besonders für das Massenscreening von Apoptose-induzierenden chemischen oder physikalischen Vorgängen. Unter chemischen Vorgängen ist beispielsweise das Einwirken von Natriumbutyrat, Deoxyglucose oder von Zytostatika zu verstehen. Unter physikalischen Vorgängen ist beispielsweise die Einwirkung von Strahlung, Druck oder Temperatur zu verstehen. Hier ist auch eine Vereinfachung des Apoptose-Nachweises aufgrund der Möglichkeit der Anwendung von FACS-Analysen möglich. FACS-Analysen zur Bestimmung der Apoptose beruhen bisher auf der Messung der DNA/Chromatin-Dichteverteilung im Zellkern bzw. der Zelle, wobei DNA/Chromatin mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt wurde, allerdings müssen für viele Fluoreszenzfarbstoffe vor deren Applikation die Zellen fixiert werden. Wie vorstehend bereits erwähnt führt diese Fixierung zur Erzeugung von Artefakten. Andererseits resultiert die Aufnahme von Fluoreszenzfarbstoffen in vivo häufig zu toxischen und/oder strukturverändernden Effekten. Diese Effekte lassen sich oft nicht von der zu untersuchenden Apoptose unterscheiden. Somit sind die bisher angewandten Untersuchungen der Apoptose nur von eingeschränkter Aussagekraft. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren entfällt nun die Fixierung der Zellen und die Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen, so daß die FACS-Analysen direkt und an der lebenden Zelle durchgeführt werden können und auch die Entstehung von Artefakten praktisch ausgeschlossen werden kann.

[0019] Eine Vereinfachung und qualitative Verbesserung der Analyse der Apoptose durch das erfindungsgemäße Verfahren ergibt sich auch bei einem Nachweis der Histonfreisetzung. Bisherige Apoptose-ELISA-Tests beruhen auf dem Nachweis und der Quantifizierung der Histonfreisetzung infolge des Chromatinabbaus während der Apoptose. Hierzu werden die Zellkerne isoliert und durch Lyse aufgeschlossen. Das Lysat wird auf ein spezielles Trägermaterial gegeben, auf dem sich gegen freie Histone gerichtete Antikörper befinden. Nach einem Waschschriff werden die freien Histon-Antikörper-Komplexe in einem mehrstufigen Verfahren angefärbt und nachgewiesen. Dieser Nachweis amplifiziert auch geringe Histon-Antikörper-Komplex-Konzentrationen. Diese aufwendigen Präparationsschritte und der mehrstufige Nachweis (und die damit verbundenen Möglichkeiten der Entstehung von Artefakten) entfallen bei dem erfindungsgemäßen Verfahren. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um einen quantitativen Nachweis, indem freigesetzte Fusionsprotein-Antikörper-Komplexe direkt (je nach Antikörperträger) nachgewiesen und quantifiziert werden, z. B. mittels des Antikörper-Screeningverfahrens ElispotTM (Zeiss, Jena). Für den Nachweis von geringen Konzentrationen dieser Komplexe eignet sich besonders FCS. Eine Farbreaktion zum Nachweis der Antikörperkomplexe wie beim konventionellen ELISA kann entfallen, da die Histone in den erfindungsgemäßen Fusionsproteinen bereits eine fluores-

zente Markierung in Form des fluoreszenten Proteins tragen. Man könnte vereinfacht von einem "Ein-Schritt-ELISA" sprechen, der den konventionellen ELISA ersetzt.

[0020] Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Isolierung von Histonproteinen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß im Anschluß an das vorstehend beschriebene in vivo-Markierungsverfahren die Histonproteine isoliert werden. Dabei werden die Histon-Proteine mittels des an das Fusionsprotein angeknüpften "His-Tags" über Affinitätschromatographie (Säulen z. B. von Fa. Clontech, Heidelberg erhältlich) gereinigt. Derart gereinigte Histon-Proteine haben den Vorteil, daß man sie als markierte Histone als Isolat einsetzen kann. Damit läßt sich auch die Kultivierbarkeit von Zellen/Geweben umgehen.

[0021] Die vorliegende Erfindung betrifft schließlich auch die vorstehend beschriebenen, das Histon-XFP-Fusionsprotein codierenden DNA-Sequenzen bzw. Expressionsvektoren und diese DNA-Sequenzen oder Expressionsvektoren enthaltende Zellen. Zu diesen Zellen zählen Bakterien (beispielsweise die E. coli-Stämme IIB101, DI11, x1776, JM101, JM109, BL21 und SG13009), Hefe, vorzugsweise S. cerevisiae, Insektenzellen, vorzugsweise sf9-Zellen, und Tierzellen, vorzugsweise Säugerzellen. Bevorzugte Säugerzellen sind CHO-, VERO-, BHK-, HeLa-, COS-, MDCK, 293- und WI38-Zellen. Verfahren zur Transformation dieser Wirtszellen, zur phänotypischen Selektion von Transformanten und zur Expression der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen sind auf dem Fachgebiet bekannt.

[0022] Wichtig zu erwähnen ist, daß mit der vorliegenden Erfindung Histone spezifisch markiert werden können, was vorher nicht der Fall war.

[0023] Von den Erfindern wurde auch ein nicht-menschliches Säugetier etabliert, das ein erfindungsgemäßes Histon-Fusionsprotein exprimiert.

[0024] Der Ausdruck "nicht-menschliches Säugetier" umfaßt jegliches Säugetier. Beispiele solcher Säugetiere sind Maus, Ratte, Kaninchen, Pferd, Rind, Schaf, Ziege, Affe, Schwein, Hund und Katze, wobei Maus bevorzugt ist ("Histon-Maus").

[0025] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Zellen, die aus dem vorstehenden nicht-menschlichen Säugetier erhalten werden. Diese Zellen können in jeglicher Form vorliegen, z. B. in einer Primär- oder Langzeit-Kultur.

[0026] Ein erfindungsgemäßes nicht-menschliches Säugetier kann durch übliche Verfahren bereitgestellt werden. Günstig ist ein Verfahren, das folgende Schritte umfaßt:

- (a) Herstellung eines DNA-Fragments, insbesondere eines Vektors, das (der) ein Histonprotein und ein fluoreszentes Protein umfassendes Fusionsprotein codiert;
- (b) Präparation embryonaler Stammzellen aus einem nicht-menschlichen Säuger (bevorzugt Maus);
- (c) Einbringen des DNA-Fragments von Schritt (a) in die embryonalen Stammzellen von Schritt (b),
- (d) Kultivieren der Zellen von Schritt (c),
- (e) Selektion der kultivierten Zellen von Schritt (d) auf das Vorhandensein des Fusionsproteins, was sich an den fluoreszenten Eigenschaften der Zellen äußert,
- (f) Erzeugen chimärer nicht-menschlicher Säuger aus den Zellen von Schritt (e) durch Injektion dieser Zellen in Säuger-Blastocysten (bevorzugt Maus-Blastocysten), Übertragen der Blastocysten in pseudo-schwangere weibliche Säuger (bevorzugt Maus) und Analyse der erhaltenen Nachkommen.

[0027] Das Einbringen der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz, die bevorzugt in einem Expressionsvektor vorliegt, erfolgt beispielsweise mittels Mikroinjektion oder der Shotgun-Methode.

[0028] Der Ausdruck "embryonale Stammzellen" betrifft jegliche embryonalen Stammzellen eines nicht-menschlichen Säugetiers. Vorzugsweise sind die embryonalen Stammzellen von der Maus, insbesondere die Zellen E14/1 oder 129/SV.

[0029] Desweiteren kennt der Fachmann Bedingungen und Materialien, um die Schritte (a)-(f) durchzuführen.

[0030] Mit der "Histon-Maus" (gilt analog natürlich auch für andere Säugetiere) ist die Gewinnung von Geweben/Zellen, die nicht oder nur schlecht in einer Zellkultur zu kultivieren sind, und die ein Histonfusionsprotein exprimieren, möglich. Diese Gewebe besitzen den Vorteil, daß sie nativ aus einem Organismus stammen und somit die komplexen Zusammenhänge, d. h. auch Krankheitsbilder im Organismus widerspiegeln. Somit können dann Strukturen, Beziehungen und Krankheitsbilder untersucht werden. Die Tiere nehmen durch die Expression eines fluoreszierenden Proteins keinen erkennbaren Schaden. Die Expression von Green Fluorescent Protein in einem lebenden Organismus wurde beispielsweise von Okabe et al., FEBS Lett. 1997, 407(3), S. 313-319 untersucht und festgestellt, daß alle Gewebe (außer Erythrozyten und Haare) des transgenen Organismus im Anregungslicht grün leuchten, aber die Tiere ansonsten keine Anomalien aufwiesen.

Beschreibung der Figuren:

[0031] Fig. 1: Schematische Karte von pSV-III α -H α -XFP

Die Bezeichnung H α bezieht sich allgemein auf ein in den Tabellen 1 und 2 näher bezeichnetes Histongen; XFP: fluoreszentes Protein, z. B. ECFP (Enhanced Cyan Fluorescent Protein) oder EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein)

[0032] Fig. 2: Schematische Karte von pSV-III α -H α -XFP-His

Die Bezeichnung H α bezieht sich allgemein auf ein in den Tabellen 1 und 2 näher bezeichnetes Histongen; XFP: fluoreszentes Protein, z. B. ECFP oder EYFP.

[0033] Fig. 3: Mikroskopische Aufnahmen von in HeLa-Zellen exprimierten Histon-XFP-Proteinen

Die Aufnahmen wurden wie in Beispiel 4 beschrieben durchgeführt.

- (A) Nucleus einer H1.0-YFP exprimierenden HeLa-Zelle
- (B) Nucleus einer H1.0-YFP exprimierenden HeLa-Zelle

- (C) Zwei apoptotische, vorher H1.0-YFP exprimierende Zellen
 (D) Zwei Nuclei von H2A-YFP exprimierenden HeLa-Zellen
 (E) Nucleus einer H2A-YFP exprimierenden HeLa-Zelle
 (F) Mitose von HeLa-Zellen: a) Metaphase (Ansicht der Plattenseite), b) Anaphase, c) Späte Anaphase oder frühe Telophase

[0034] Fig. 4: Mikroskopische Aufnahmen der Natriumbutyratinduzierten Apoptose von H1.0-YFP und H2A-YFP exprimierenden HeLa-Zellen

Die Aufnahmen wurden wie in Beispiel 5 beschrieben durchgeführt. Die Aufnahmen wurden 36 (bzw. 12) Stunden nach Induktion der Apoptose hergestellt.

- (A) H1.0-YFP; Kontrollnucleus ohne Natriumbutyrat-Behandlung
 (B) H2A-YFP; Kontrollnucleus ohne Natriumbutyrat-Behandlung
 (C) H1.0-YFP; Nucleus mit apoptotischem Strukturverlust, fast homogener Nucleus (Im Vergleich zu (A) die gleiche Laser-Intensität und gleicher Kontrast; Laser-Intensität: 420, Kontrast: 2752)
 (D) H2A-YFP; Nucleus mit apoptotischem Strukturverlust, fast homogener Nucleus (Im Vergleich zu (B) die gleiche Laser-Intensität und gleicher Kontrast; Laser-Intensität: 424, Kontrast: 4490)
 (E) H1.0-YFP; apoptotischer Halbmond und beginnende Agglomeration des Chromatins (Zoom: 8; Pixelabmessungen (seitlich): 49,6 nm)
 (F) H2A-YFP; apoptotischer Halbmond vor der wirklichen Agglomeration des Chromatins (Zoom: 8; Pixelabmessungen (seitlich): 49,6 nm)
 (G) H1.0-YFP; apoptotische Kondensation des Zellnucleus (Zoom: 8; Pixelabmessungen (seitlich): 49,6 nm)
 (H) H2A-YFP; apoptotische Kondensation des Zellnucleus (Zoom: 8; Pixelabmessungen (seitlich): 49,6 nm)
 (I) H1.0-YFP; Endstadium der apoptotischen Kondensation des Zellnucleus vor Zellfragmentierung
 (J) H1.0-YFP; apoptotische Zellfragmentierung (Zoom: 8; Pixelabmessungen (seitlich): 49,6 nm)
 (K) H2A-YFP; apoptotische Zellfragmentierung
 (L) H1.0-YFP; Übersicht der Apoptose, die den apoptotischen Strukturverlust und apoptotische Halbmonde zeigt (Zoom: 2,5 Pixelabmessungen (seitlich): 150 nm; Laser-Intensität: 475; Kontrast: 0)

[0035] Fig. 5: Sequenzen von pSV-HIII-CFP sowie der Histone H1.0, H2A.1, H2Ba, H3.1, H4.a und mH2A1.2
 Die Histonsequenzen werden dabei in die MCS 2. Teil kloniert.

[0036] Die nachstehenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Konstruktion der Ausgangsvektoren für die Insertion der Histongene

[0037] Es wurden die Plasmide pSV-HIII-CFP und pSV-HIII-YFP-His hergestellt. Beide Plasmide basieren auf dem keinen Promotor aufweisenden Plasmid pECFP-1 (Clontech, Heidelberg). Zur Verwendung dieses Vektors in eukaryotischen Zellen wurde daher die SV40-Promotor/Enhancer-Region (1118 Basenpaare des Bereichs von Position 5171 bis 1046) in die HindIII-Stelle der Mehrfachclonierungsstelle (MCS) des Plasmids pECFP-1 inseriert. Dieser regulatorische HindIII-Bereich (SV 40 mit HindIII geschnitten ergibt 6 Fragmente, die der Größe nach mit Buchstaben gekennzeichnet werden) wurde in umgekehrter Orientierung inseriert, da dadurch eine höhere Expressionseffizienz erreicht wird. Dies führte zum Erhalt des Plasmids pSV-HIII-CFP (s. Fig. 5). Das Plasmid pSV-HIII-YFP wurde von pSV-HIII-CFP durch Austausch des CFP-Gens gegen das YFP-Gen von Plasmid pEYFP-NUC (Clontech) erhalten. Für diesen Austausch wurden die AgeI-Stelle der MCS und die 6 Basenpaare vor dem XFP-Stopcodon liegende BsrGI-Stelle verwendet. Die Gene für CFP und YFP unterscheiden sich in diesen Bereichen nicht, somit führte der Austausch nicht zu Basenpaaränderungen. Die in dem nachstehenden Beispiel 2 beschriebenen Histongene wurden in die so erhaltenen Plasmide pSV-HIII-CFP und pSV-HIII-YFP inseriert.

Beispiel 2

Gewinnung von Histongen über PCR mit gleichzeitiger Erzeugen von für die Ligation geeigneten Termini

[0038] Die Histongene wurden in die MCS zwischen den regulatorischen HindIIIc-Bereich und das Startcodon des XFP-Gens cloniert. Die Histongene wurden mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von die Histongene H1.0, H2A1 bzw. H2Ba enthaltenden Plasmiden, Caski genomischer DNA (H3.1, H4a) oder dem cDNA-Klon mH2A1.2 (IMAGp998A141538, I.M.A.G.E. Consortium) amplifiziert. Die PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 100 µl in kleinen silikonisierten 600 µl-Eppendorf-Reaktionsgefäßen aus Polypropylen (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf). Für die Reaktion wurden 10 µl GenAmpTM 10X PCR-Puffer II (Hoffmann-La Roche, Basel), 2 µl eines dNTP-Gemischs (Konzentration jeweils 25 mM; Peqlab Biotech GmbH, Erlangen), 8 µl MgCl₂-Lösung (25 mM; Perkin Elmer) und 2 Einheiten DNA Polymerase AmpliTaqTM (2 E/µl; Perkin Elmer) verwendet. Als PCR-Matrize wurden 4 ng Plasmid-DNA oder 1 µg genomische DNA (maximal 3 µl) verwendet. Jeweils 0,3 µg "Vorwärts"- bzw. "Rückwärts"-Primer (siehe Tabelle I) wurden verwendet (maximal 3 µl). Zur Vermeidung von Verdunstung während der PCR-Zyklen wurde das Reaktionsgemisch mit 40 µl "Chill-out 14TM Liquid Wax" (MJ Research, Inc., Fa. Biozym, Oldendorf) überschichtet. Für die PCR-Zyklen wurde einleitend zuerst 3 Minuten auf 96°C erhitzt, danach folgten 30 Zyklen (für Plasmid-DNA) oder 33 Zyklen (für genomische DNA) (30 Sekunden Denaturierung bei 96°C, 30 Sekunden Primer-Anlagerung bei 50°C, 30 Sekunden Primer-Verlängerung bei 72°C und am Ende 10 Minuten Primer-Verlängerung bei 72°C). Die

DE 100 13 204 A 1

PCR wurde zuerst in zwei Reaktionsgefäßen getestet und danach in größerem Maßstab (bis zu 10fach) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden von Enzymen, Salzen, verbliebenen Primern und dNTPs mit dem QIAquick™-PCR-Reinigungs-kit (Qiagen, Hilden) gereinigt. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte auf kleinen 8% Polyacrylamidgelen (6 cm Gel, TBE-Puffer) 90 Minuten bei 90 V unter Verwendung von Lambda-HindIII-Fragmenten und einer 100bp-Leiter (Gen Sura) als Längenmarker nach der Testreaktion (vor und nach der Reinigung).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 100 13 204 A 1

Tabelle I

Für die Vektorkonstruktion verwendete Primer

	Histon	Primerrichtung	Restriktionsstelle	Sequenz der Restriktionsstelle	Sequenz im Histongen	Primerlänge [bp]
5						
	H1.0	V	SalI	CAGTCGACG	ATGACCGA- GAATTCCA- CG	27
10						
		R	BamHI	TGGATCCCG	CTTCTTCT- TGCCGGCC- CT	27
15						
	H2A.1	V	EcoRI	CGAATTCTG	ATGTCGGG- ACGCGGCA- AG	27
20						
		R	BamHI	TGGATCCCG	TTTGCCTT- TGGCCTTG- TG	27
25						
	mH2A1.2	V	EcoRI	CTTCGAAT- TCTG	ATGTCGAG- CCGCGGTG- GG	30
30						
		R	SalI	TACCGTCG- ACTG	GTTGGCGT- CCAGCTTG- GC	30
35						
		"Vorwärts"- Sequenz- ierung	-	-	GGAAGCCA- TCATCACA- CCACC	21
40						
		"Rückwärts"- Sequenz- ierung	-	-	CCAGCTAC- TTCCAAGG- GCCCCG	21
45						
	H2Ba	V	EcoRI	CTTCGAAT- TCTG	ATGCCTGA- ACCAGCT	27
50						
		R	BamHI	CGGTGGAT- CCCG	CTTGGAGC- TTGTATAC- TTGG	32
55						
	H3.1	V	EcoRI	CTTCGAAT- TCTG	ATGGCTCG- TACGAAGC- AAACAGCT	36
60						
		R	BamHI	CGGTGGAT-	TGCCCTTT-	33
65						

			CCCG	CCCCACGG-		
				ATGCG		
H4a	V	EcoRI	CTTCGAAT-	ATGTCTGG-	33	5
			TCTG	ACGTGGTA-		
				AGGGC		
	R	BamHI	CGGTGGAT-	ACCGCCAA-	32	10
			CCCG	AGCCATAA-		
				AGGG		

(V="Vorwärts"-Primer, R="Rückwärts"-Primer; die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben, die Sequenz beispielsweise des "Vorwärts"-Primers für mH2A1.2 lautet somit 5'-CTTCGAATTCTGATGTCGAGCCGCGGTGGG-3'.)

[0039] Die Restriktionsenzyme für die Restriktion der PCR-Produkte zur Insertion in die Plasmide pSV-HIII-H_x-XFP und pSV-HIII-H_x-XFP-His (siehe Fig. 1) sind in den Tabellen I und II aufgelistet. Zur Spaltung mit den Restriktionsenzymen wurden maximal 10 µg des PCR-Produkts bzw. 20 µg des Empfängerplasmids verwendet. 10 bis 20 Einheiten (1 oder 2 µl) Restriktionsenzym und 3 µl 10X-Restriktionspuffer (10X Puffer B oder H von Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) wurden in einem 30 µl-Reaktionsvolumen verwendet und es wurde über Nacht inkubiert. Zur Spaltung von EcoRI/BamHI- und EcoRI/SalI-Stellen wurden Doppelspaltungen durchgeführt. Die gespaltenen PCR-Produkte wurden entweder direkt mit dem QIAquickTM-PCR-Reinigungs kit (Qiagen) gereinigt oder aus einem 1% Agarosegel (20 cm Gel, TAE-Puffer, 150 V, 4°C) ausgeschnitten und danach mit dem QIAquickTM-Gelelektionskit (Qiagen) oder dem UltrafreeTM-DNA-Gelelektionskit (Millipore, Molsheim, Frankreich) extrahiert. Zur weiteren Reinigung wurden eine Ethanolpräzipitation und ein anschließender Waschschrift mit 70% Ethanol durchgeführt.

Tabelle 2

Konstruierte und in vivo untersuchte Plasmide

Tabelle

bp = Basenpaare, kbp = Kilobasenpaare, AA = Zahl der Aminosäuren. für BFP, CFP, GFP, YFP

Plasmid Name	Histon	Länge des Histones [bp] ([AA])	Terminalität des XFP in Bezug zum Histon	Multiple Cloning Site MCS Site	Fluorescent Protein (717bp) (239AA)	Spacer zwischen Histon und XFP [bp] ([AA])	Gesamtlänge des Fusionsproteins [bp] [AA]	Plasmidgröße [kbp]	His Tag Vorhanden?
pSV-H1.0-CFP	H1.0	582 (194)	N-	Sal1 BamH1	ECFP	21 (7)	1320 (440)	5.9	Nein
pSV-H1.0-YFP	H1.0	582 (194)	N-	Sal1 BamH1	EYFP	21 (7)	1320 (440)	5.9	Nein
pSV-H10-YFP-HIS	H1.0	582 (194)	N-	Sal1 BamH1	EYFP	21 (7)	1320+66 _{HIS} (462)	5.9	Ja
pSV-H2A1-CFP	H2A.1	390 (130)	N-	EcoR1 BamH1	ECFP	21 (7)	1128 (376)	5.7	Nein
pSV-H2A1-YFP	H2A.1	390 (130)	N-	EcoR1 BamH1	EYFP	21 (7)	1128 (376)	5.7	Nein
pSV-mH2A1.2CFP	mH2A1.2	1116 (372)	N-	EcoR1 Sal1	ECFP	42 (14)	1875 (625)	6.4	Nein
pSV-mH2A1.2YFP	mH2A1.2	1116 (372)	N-	EcoR1 Sal1	EYFP	42 (14)	1875 (625)	6.4	Nein
pSV-H2Ba-CFP	H2Ba	378 (126)	N-	EcoR1 BamH1	ECFP	21 (7)	1116 (372)	5.7	Nein
pSV-H2Ba-YFP	H2Ba	378 (136)	N-	EcoR1 BamH1	EYFP	21 (7)	1116 (372)	5.7	Nein
pSV-H3.1-CFP	H3.1	408 (136)	N-	EcoR1 BamH1	ECFP	21 (7)	1146 (382)	5.7	Nein
pSV-H3.1-YFP	H3.1	408 (136)	N-	EcoR1 BamH1	EYFP	21 (7)	1146 (382)	5.7	Nein
pSVHIII-H4.a-CFP	H4a	309 (103)	N-	EcoR1 BamH1	ECFP	21 (7)	1047 (349)	5.7	Nein
pSVHIII-H4.a-YFP	H4a	309 (103)	N-	EcoR1 BamH1	EYFP	21 (7)	1047 (349)	5.7	Nein

Tab. 2

gilt für RFP, mit Sequenz von Ds-Red-N1, von Clontech, Heidelberg

Plasmid Name	Histon	Länge des Histones [bp] ([AA])	Terminalität des XFP in Bezug zum Histon	Multiple Cloning Site MCS Site	Fluorescent Protein (681bp) (227AA)	Space zwischen Histon und RFP [bp] ([AA])	Gesamtlänge des Fusionsproteins [bp] [AA]	Plasmidgröße [kbp]	His Tag Vorhanden?
pSV-H1.0-RFP	H1.0	582 (194)	N-	SalI BamHI	RFP	21 (7)	1284 (428)	5.9	Nein
pSV-H2A1-RFP	H2A.1	390 (130)	N-	EcoRI BamHI	RFP	21 (7)	1092 (364)	5.7	Nein
pSV-mH2A1.2RFP	mH2A1.2	1116 (372)	N-	EcoRI SalI	RFP	42 (14)	1839 (613)	6.4	Nein
pSV-H2Ba-RFP	H2Ba	378 (126)	N-	EcoRI BamHI	RFP	21 (7)	1080 (360)	5.7	Nein
pSV-H3.1-RFP	H3.1	408 (136)	N-	EcoRI BamHI	RFP	21 (7)	1110 (370)	5.7	Nein
pSVHIII-H4.a-RFP	H4a	309 (103)	N-	EcoRI BamHI	RFP	21 (7)	1011 (337)	5.7	Nein

[0040] Alle Plasmide tragen Gene für Kanamycin- und Neomycin-Resistenz zur Verwendung als "Shuttle"-Vektor und Selektion in Prokaryoten und Eukaryoten. Alle Plasmide wurden in kompetente Zellen (Epicurian Coli™ XL10-Gold Ultra Competent, Fa. Clontech, Heidelberg) transformiert.

Beispiel 3

Insertion einer His-Tag-Sequenz

[0041] Die His-Tag-Sequenz wurde synthetisch hergestellt. Sie enthält eine BsrGI- und NotI-Stelle zur Insertion nach dem XFP-Gen (C-terminal) direkt vor dem Stopcodon. Die Sequenz des Sense-Strangs ist GAG CTG TAC AAG AAG GAT CAT CTC CAC AAT GTC CAC AAA GAG GAG CAC GCT CAT GCC CAC AAC AAG TAA AGC GGC CGC GAC T, die Sequenz des Antisense-Strangs A GTC GCG GCC GCT TTA CTT GTT GTG GGC ATG AGC GTG CTC CTC TTT GTG GAC ATT GTG GAT GAG ATG ATC CTT CTT GTA CAG CTC. Die Zusammenlagerung der beiden Stränge zum Doppelstrang erfolgte durch Vermischen äquimolarer Mengen der beiden Einzelstränge und Inkubation bei erhöhter Temperatur (2 Minuten 90°C, 10 Minuten 65°C, 10 Minuten 37°C, über Nacht bei Raumtemperatur). Das Produkt wurde wie vorstehend für die PCR-Produkte beschrieben gereinigt und danach in das entsprechende Plasmid kloniert, wobei das Plasmid pSV-HIII-XFP-His erhalten wurde (siehe Fig. 2).

Beispiel 4

Ligation und Transformation in Bakterien

[0042] Das Empfängerplasmid (siehe Tabelle 2; maximal 3 µg) wurde mit den PCR-Produkten (maximal 300 ng) vermischt. 1 E T4 DNA-Ligase (1 E/µl, Boehringer Mannheim) und 3 µl 10X T4 Ligase-Puffer (Boehringer Mannheim) wurden in einem Reaktionsvolumen von 30 µl verwendet. Die Reaktion wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Zur Transformation von "Epicurian Coli™ XL10-Gold Ultra Competent Cells" (Fa. Clontech, Heidelberg) Aliquot der bei -80° eingefrorenen Bakterien-Stocksuspension auf Eis 10 Minuten aufgetaut. Dann wurden 1,7 µl β-Mercaptoethanol zugegeben und das Ganze wurde unter vorsichtigem Vermischen (alle 2 Minuten) 10 Minuten auf Eis gehalten. Schließlich wurden 10 µl Ligationsgemisch (maximal 1 µg) und 10 µl LB-Medium zugegeben. Nach 30minütiger Inkubation wurde für 42 Sekunden eine Hitzebehandlung bei 42°C durchgeführt. Danach wurden die Zellen auf Eis 2 Minuten abgekühlt, dann 450 µl SOC-Medium (20 g/l Bactotrypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 2,5 mM KCl, 20 mM Glucose, pH-Wert 7,5, sterilfiltriert) zugegeben und die Bakterien wurden 60 Minuten bei 37°C inkubiert, wobei alle 10 Minuten vorsichtig vermischt wurde. Schließlich wurden die Bakterien auf Agarplatten unter Kanamycinselektion (30 µg/ml) ausplattiert. Erscheinende Klone wurden nach 24 Stunden Inkubation abgenommen, in 20 ml LB-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin überführt und bei 37°C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Plasmid-DNA wurde aus den Bakterien mit dem "Nucleo Bond Plasmid"-Kit (Stratagene) extrahiert. Die erfolgreiche Ligation wurde durch Restriktion von 300 ng Vektor-DNA unter Verwendung der gleichen Restriktionsenzyme zum Herausschneiden der Insertionen getestet. Der geschnittene Vektor wurde hinsichtlich der korrekten Insertion der Histongene in einem 1% Agarose-Gel analysiert. DNA positiver Klone wurde dann bezüglich des inserierten Histogens mit dem "Rückwärts"-Primer EGFP N1 (5'-CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G-3') (Fa. Clontech, Heidelberg) sequenziert.

Dieser Primer liegt innerhalb des XFP-Gens, so daß die Reinheit der Histon-Insertion bestimmt werden kann. Von korrekten Klonen wurden dann größere Mengen präpariert.

Beispiel 5

Transfektion der Konstrukte in HeLa-Zellen und Herstellung mikroskopischer Aufnahmen der HeLa-Zellen

[0043] 0,9 ml RPMI 1640 Medium (Gibco BRL, Freiburg) und etwa 4 µg pSV-HIII-H_x bzw. pSV-HIII-H_x-His wurden vermischt und mit einem Millex-GV4-22 µm-Filter (Millipore, Molsheim, Frankreich) sterilfiltriert. Zur gleichen Zeit wurden 0,9 ml RPMI 1640 Medium mit 10 µl Lipofectamin ("Transfection Reagent Kit", Gibco BRL) vermischt. Beide Gemische wurden ebenfalls miteinander vermischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 5mal vorsichtig vermischt. In der Zwischenzeit wurden kleine Zellkulturflaschen mit etwa 10⁶ HeLa-Zellen zweimal mit RPMI 1640 Medium gewaschen und das Transfektionsgemisch wurde zugegeben. Nach 6 Stunden Inkubation wurde das Transfektionsgemisch verworfen und es wurden 10 ml RPMI 1640 Medium mit 10% FCS zugegeben. Mindestens 60% der HeLa-Zellen zeigten nach 24 Stunden eine positive Transfektion. Zur Erzielung einer stabilen Transfektion wurden die Zellen in Gegenwart von G418 (500 µl/ml) selektiert, was nach zwei Wochen zum Erhalt von mehr als 85% positiven HeLa-Zellen führte. Zum Erhalt einer homogenen Zellpopulation hinsichtlich der XFP-Fluoreszenz wurden die Zellen trypsinisiert, verdünnt und in "Linbro"-Platten gegeben (Fa. Nung, Naperville, IL, USA). Positive Klone wurden abgenommen und weitergezüchtet. Dies ergab 99% positive HeLa-Zellen mit gleicher Fluoreszenz. Die HeLa-Zellen wurden üblicherweise zweimal pro Woche trypsinisiert, wobei sich offensichtlich keine Auswirkung auf die Expression oder Fluoreszenz des Fusionsproteins zeigte. Zur Herstellung mikroskopischer Aufnahmen von Einzelzellen zur Bestimmung der Dichteverteilung von DNA/Chromatin während der G1- und G2-Phase wurden die Zellen trypsinisiert und in 8 Kammerzellen der Fa. Nung (Naperville, IL, USA) ausgesät und kultiviert. Die Aufnahmen wurden mit einem "Zeiss 410" konfokalen Laserscanning-Mikroskop (CLSM, Zeiss, Jena) mit folgenden Parametern aufgenommen: Bildabmessungen: 512 × 512 Pixel; Lochblende: 17; Zoom: 6,0; Durchschnittsermittlung: Mittelung 16 mal über eine Bildebene; Laser-Anregungswellenlänge: 488 nm; Laser-Intensität 410 ± 10; Kontrast: 4500 ± 100, Pixeldimension (seitlich): 79 nm. Die Aufnahmen wurden mit einem 3 · 3 Median-Filter gefiltert (siehe Fig. 3).

Beispiel 6

Untersuchung von Apoptose mittels der Histon-XFP-Fusionsproteine

[0044] In HeLa-Zellen, die mit den in den vorstehenden Beispielen und Tabellen beschriebenen, H1.0-YFP und H2A-YFP exprimierenden Konstrukten transformiert worden und wie in Beispiel 4 behandelt worden waren wurden mittels 6 mM Natriumbutyrat gemäß Standardverfahren Apoptose induziert. Die Apoptose-Aufnahmen wurden mit einem "Zeiss 410" konfokalen Laserscanning-Mikroskop (CLSM, Zeiss, Jena) mit folgenden Parametern aufgenommen: Bildabmessungen: 512 × 512 Pixel; Lochblende: 17; Zoom: 6,0; Durchschnittsermittlung: Mittelung 32 mal über eine Bildebene; Laser-Anregungswellenlänge: 488 nm; Laser-Intensität 450 ± 10; Kontrast: 4500 ± 10, Pixeldimension (seitlich): 66,1 nm. Die Aufnahmen wurden mit einem 3 · 3 Median-Filter gefiltert (siehe Fig. 4).

Patentansprüche

1. Verfahren zur in vivo-Markierung von DNA/Chromatin-Strukturen in einer Zelle, **dadurch gekennzeichnet**, daß in der Zelle eine DNA-Sequenz exprimiert wird, die ein ein Histonprotein und ein fluoreszentes Protein umfassendes Fusionsprotein codiert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das fluoreszente Protein den C-terminalen Anteil des Fusionsproteins darstellt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz in einen Expressionsvektor inseriert und mit einem Promotor funktionell verknüpft ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Promotor ein SV40-Promotor ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein außerdem ein His-Tag enthält.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das fluoreszente Protein BFP, CFP, GFP, RFP oder YFP ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Histonprotein aus einem Säuger tier stammt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Histonprotein aus Mensch stammt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Histonprotein aus den Gruppen H1, H2A, mH2A, H2B, H3 oder H4 ausgewählt ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Histonprotein H1.0, H2A.1, mH2A1.2, H2Ba, H3.1, Makro H2A oder H4a ist.
11. Verfahren zur Analyse der DNA-Struktur, Chromatin-Struktur, Nucleus-Struktur, Zellstruktur und/oder Zelldynamik, dadurch gekennzeichnet, daß im Anschluß an das in einem der Ansprüche 1 bis 10 beschriebene Verfahren die Zellen einer Analyse der räumlichen Verteilung der Fluoreszenz unterzogen werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Analyse ein "Fluorescence Resonance Energy Transfer" (FRET), eine "Fluorescence Correlation Spectroscopy" (FCS), eine "Confocal Laser Scanning Microscopy" (CLSM), Epifluoreszenz-Mikroskopie oder eine "Flow Associated Cell Sorting" (FACS) ist.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12 zum Nachweis von Apoptose oder Lokalisierung von Genomschädigungen.
14. Verfahren zur Isolierung von Histonproteinen, dadurch gekennzeichnet, daß im Anschluß an das in einem der Ansprüche 5 bis 10 beschriebene Verfahren die Histonproteine über Affinitätschromatographie isoliert werden.
15. DNA-Sequenz, die ein Histonprotein und ein fluoreszentes Protein umfassendes Fusionsprotein codiert. 5
16. DNA-Sequenz nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das fluoreszente Protein den C-terminalen Anteil des Fusionsproteins darstellt.
17. DNA-Sequenz nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz in einen Expressionsvektor inseriert und mit einem Promotor funktionell verknüpft ist.
18. DNA-Verfahren nach Anspruch 17, wobei der Promotor ein SV40-Promotor ist. 10
19. DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 15–18, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein außerdem ein His-Tag enthält.
20. DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 15–19, dadurch gekennzeichnet, daß das fluoreszente Protein BFP, CFP, GFP, RFP oder YFP ist.
21. DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 15–20, dadurch gekennzeichnet, daß das Histonprotein aus einem Säugetier stammt. 15
22. DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 15 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß das Histonprotein aus Mensch stammt.
23. DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 15 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß das Histonprotein aus den Gruppen H1, H2A, mH2A, H3 oder H4 ausgewählt ist. 20
24. DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 15 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß das Histonprotein H1.0, H2A.1, mH2A1.2, H2Ba, H3.1, Makro H2A oder H4a ist.
25. Zelle, die die DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 15–24 enthält.
26. Zelle nach Anspruch 25, die eine Säugerzelle ist.
27. Zelle nach Anspruch 26, die eine HeLa-Zelle ist. 25
28. Nichtmenschliches Säugetier, das ein Fusionsprotein umfassend ein Histonprotein und ein fluoreszentes Protein exprimiert.
29. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1–14 umfassend eine DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 15–24 und/oder eine Zelle nach Anspruch 24 oder 25 sowie übliche Puffer, Reagenzien und/oder Behälter. 30

Hierzu 13 Seite(n) Zeichnungen

35

40

45

50

55

60

65

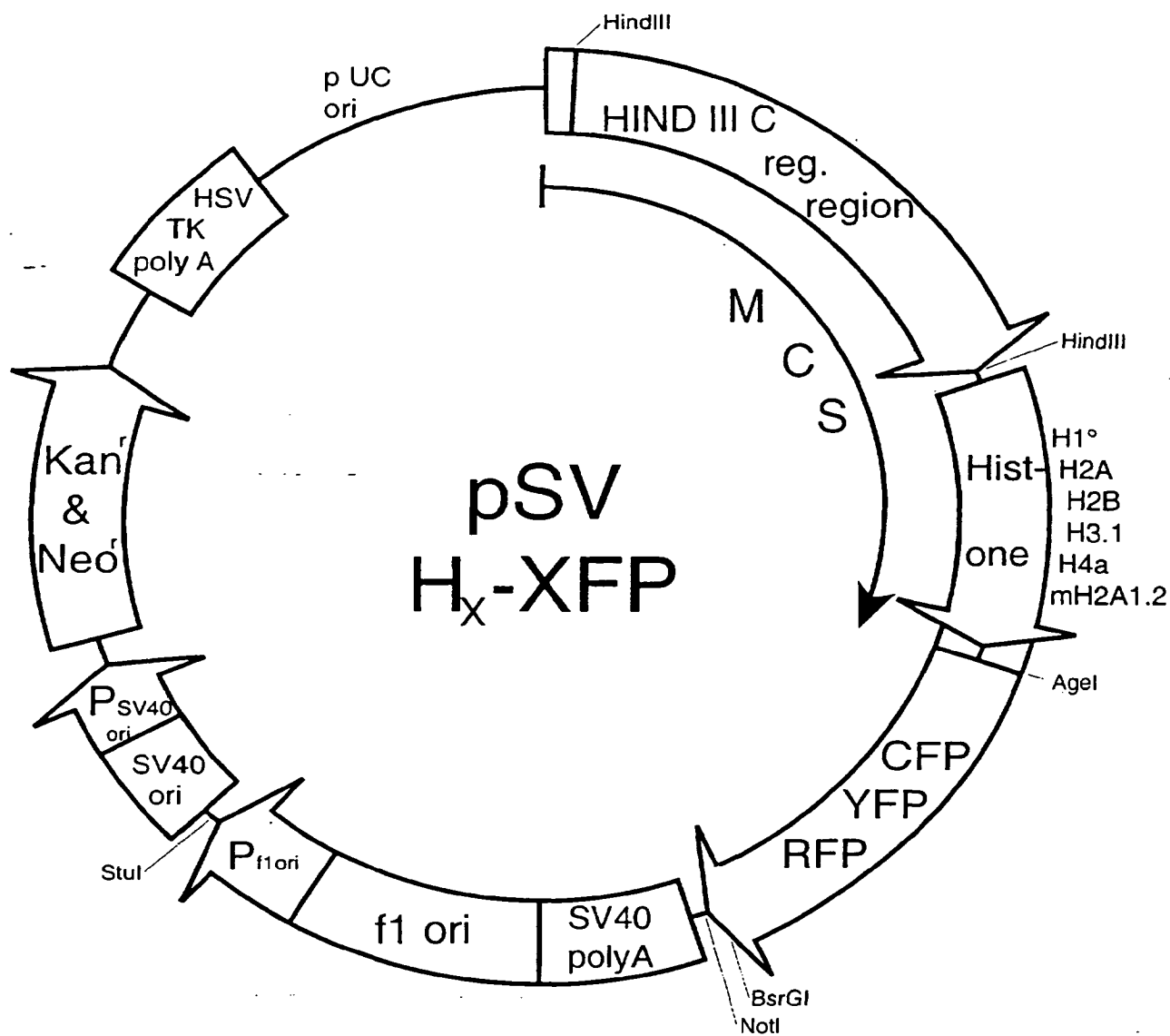


Fig. 1

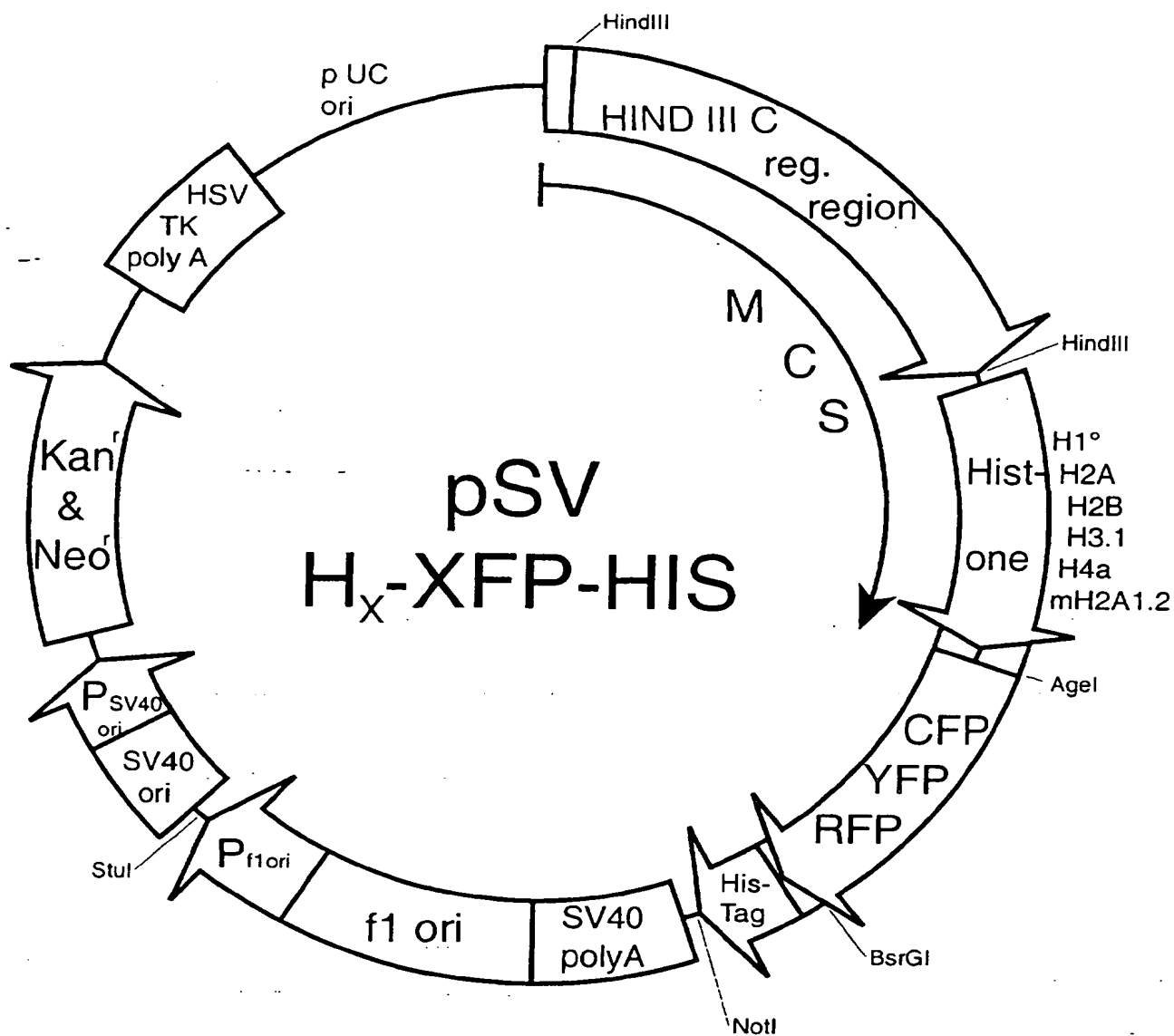


Fig. 2

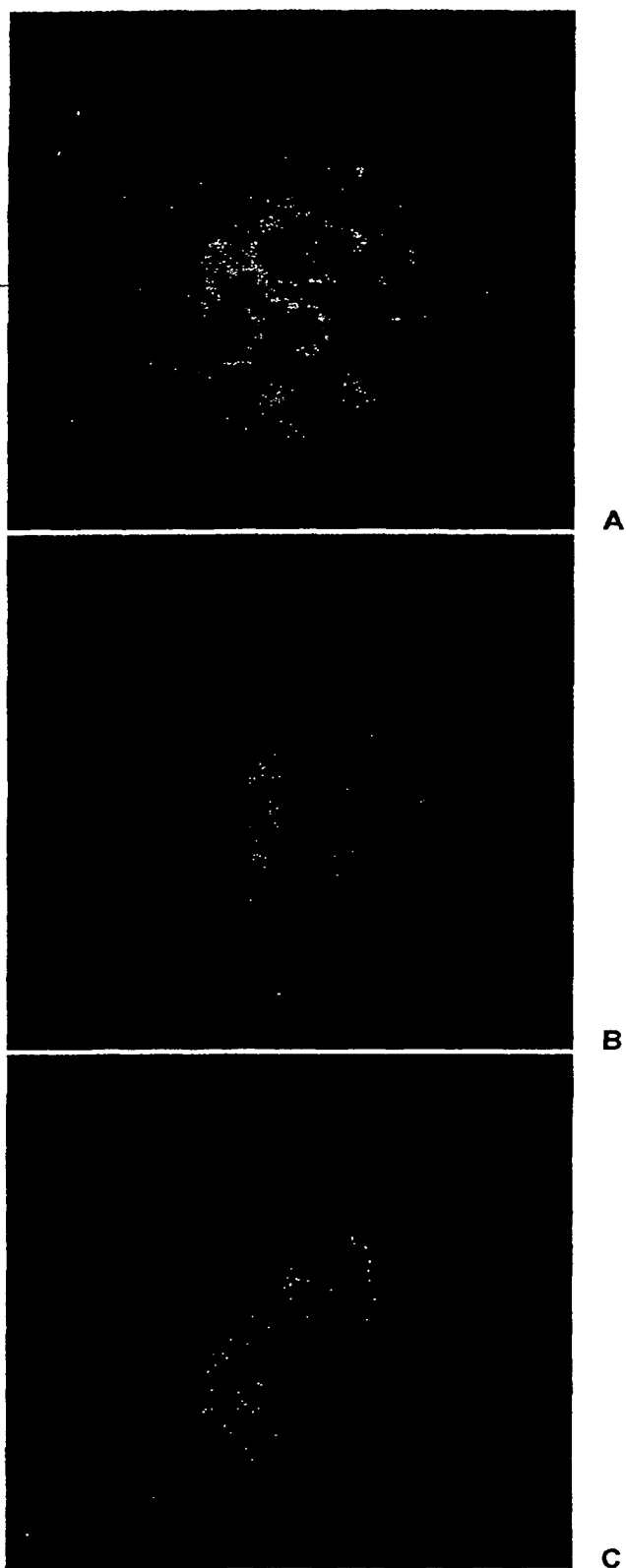


Fig. 3



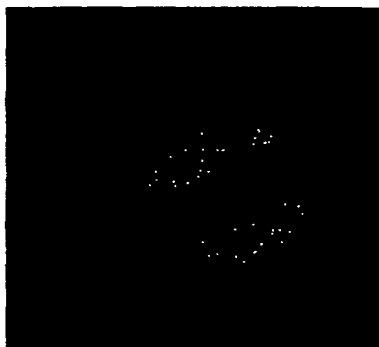
D



E



F a)



F b)

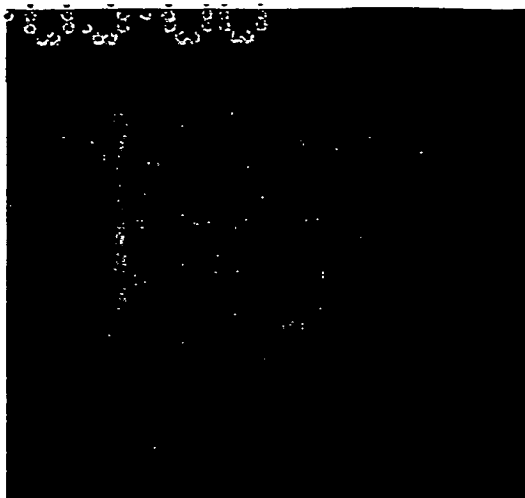


F c)

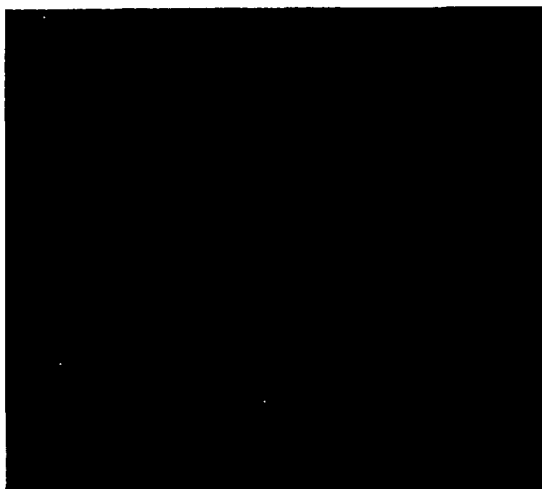
Fig. 3 Forts. 1



A



B



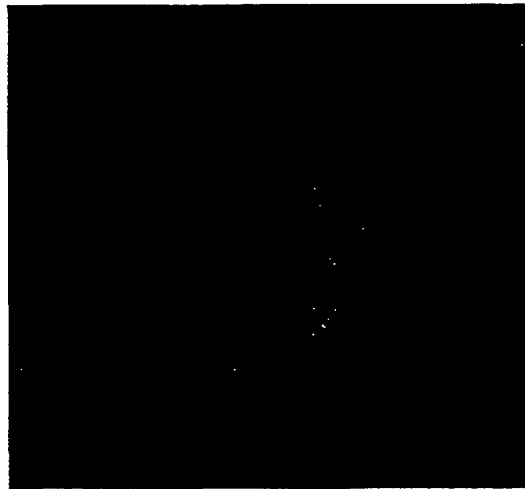
C



D

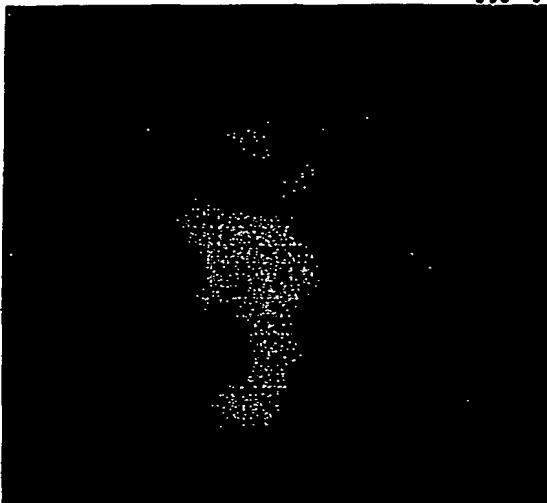


E

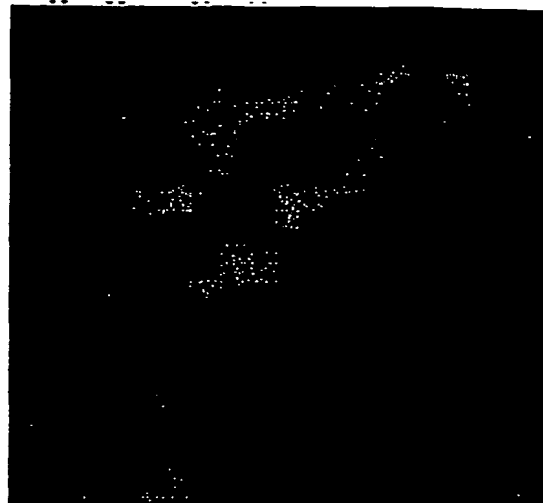


F

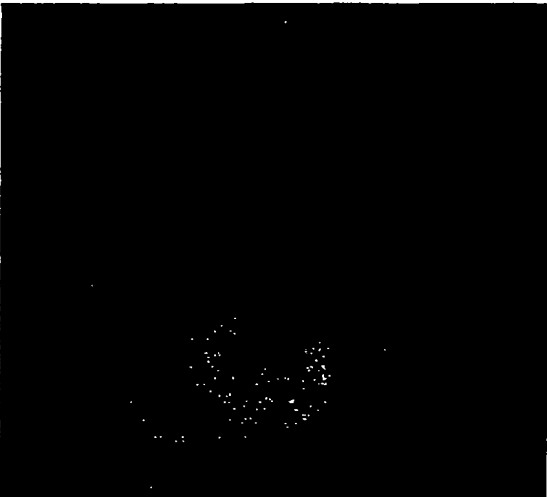
Fig. 4



G



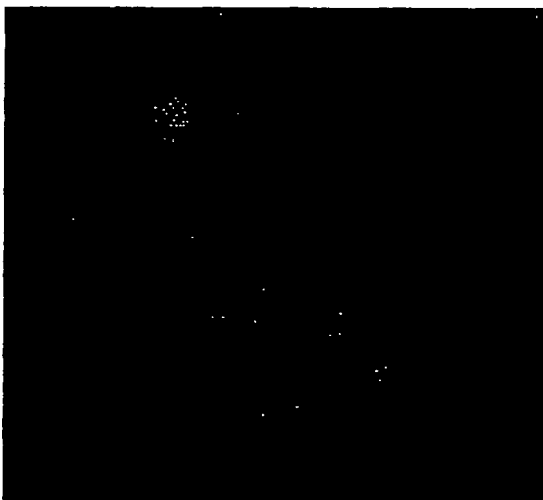
H



I

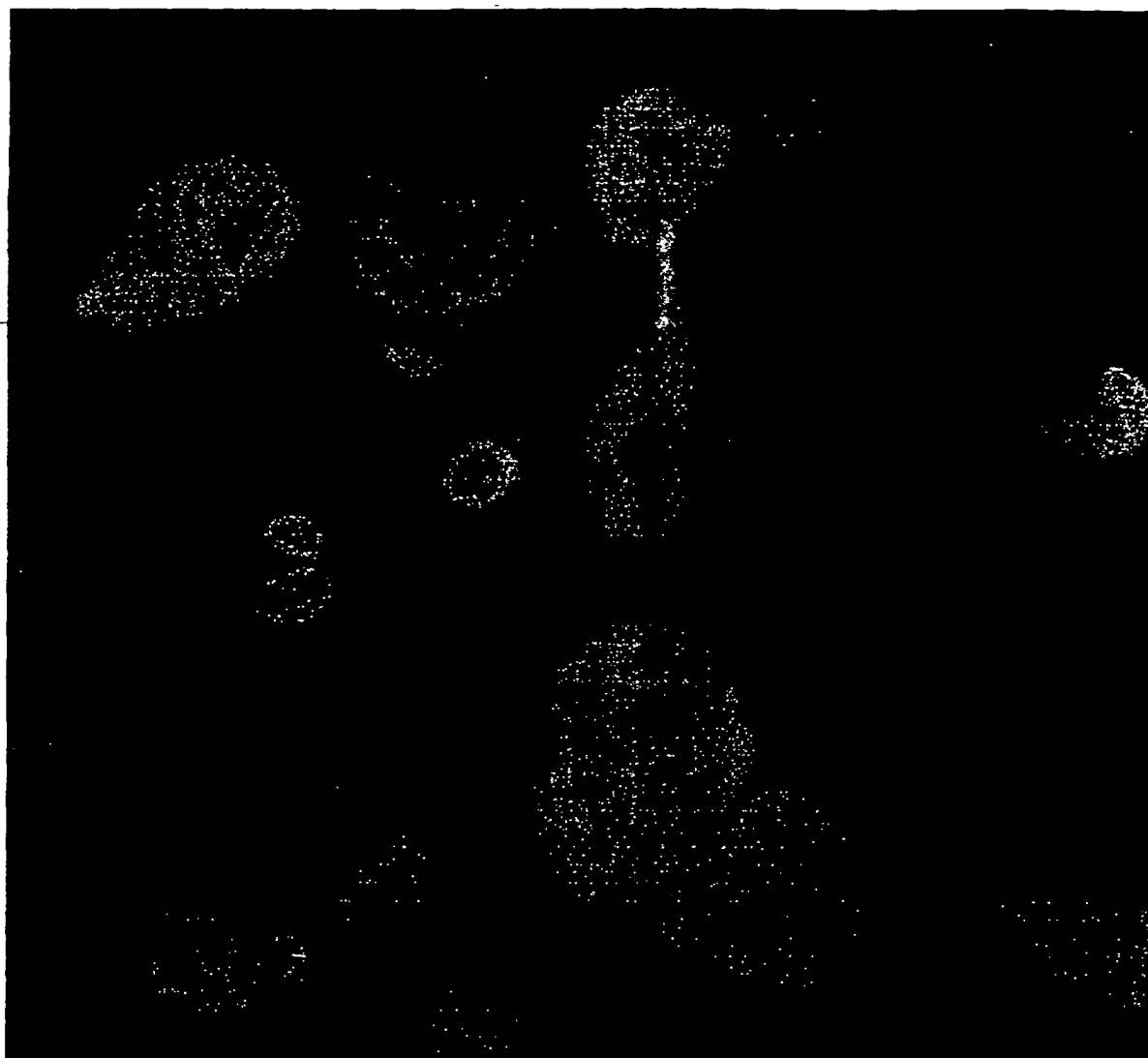


J



K

Fig. 4 Forts. 1



L

Fig. 4 Forts. 2

Sequenzen von pSV-HIII-CFP
und der
Histone H1.0, H2A.1, H2B.a, H3.1, H4.a, mH2A1.2

Komplette Sequenz von pSV-HIII-CFP (CFP kann mit anderen XFPs ersetzt werden):

Plasmidanfang:
TAGTTATTAC

MCS 1. Teil:
TAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTC

HindIII-Site:

AAGCTTGAGAAATGGCATTAAAAAGTGTTGGACCCCAATGTCTGGGGTCAAGA
TACTGAACACTGTGAACAAAGGTTTGTACTCCAGGAAATAAAATATCATAGTA
ATCATCTGGCCTATACAAATCTACAGCCATTCTGTTGTTGATATAAACCAAC
AGTAGAACTTTGTGATCCCAGTCACTAAAAATCTATACCCCACTTGAGCAAC
AGCGCTCACACCAGTCACAGTTTGCAGTAAAGCTGCAAATCCAGCTATAGCAG
CAGGAGCCCCAGATATCACAGCATAGGCCTGTGGAGTGAGGCCTATAGCAGCA
ATTGCCTCAGAGGTTGTTAGGCCTTCAACAGTAGCAACAGATGCAAGTTGCAC
TTCAATTGCAGCAGCGGCCTCTCCAGCAGCAATTTTCAGCTACTGAAAATCCAG
TAGCAGCAGCAGCTTCAGACACAGTAGCAATTAGGTCCCCCAACAGTGTTAAA
GCAGCACCCATGGACCTGAAATAAAAGACAAAAAGACTAACTTACCAGTTAAC
TTTCTGGTTTTTTCAGTTAACCTTTCTGGTTTTTTTGCCTTTCCCGTCAACAGTA
TCTTCCCCTTCACAAAATTGCAGCAAAAGCTCTAAAACAAACACAAAAAGGCGT
TGAGCTGTTTTTTTACTTTTCAGTCCATGACCTACGAACCTTAACGGAGGCCTG
GCGTGACAGCCGGCGCAGCACCATGGCCTGAAATAACCTCTGAAAGAGGAACT
TGGTTAGGTACCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGTCAGT
TAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAGCATG
CATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGG
CAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCC
TAACTCCGCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCC
ATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGTCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCT
GAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAA
AAAGCTT

MCS 2. Teil:
CGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCCACCGGTCGCCACC

Fig. 5

Begin CFP

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCG
AGCTGGACGGCGACGTAAACGGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGA
GGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCA
AGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCGAG
TGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGC
CATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCA
ACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGC
ATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAA
GCTGGAGTACAATACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGA
AGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGC
GTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGT
GCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACC
CCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGG
GATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCGACTCTAGAT
CATAATCAGCCATAACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCC
ACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTT
GTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTAC
AAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAA
TGATCTTAAGGCGTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTA
AATTTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATC
CCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTG
GAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAA
CCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTT
TTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCG
ATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAG
AAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGC
GCGTAACCACACACCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGT
GGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAAT
ACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATA
ATATTGAAAAAGGAAGAGTCCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGT
GTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAA
AGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCC
AGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCC

Fig. 5 Forts. 1

Fig. 5 Forts. 2

CGCCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTTCTC
CGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCG
GCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCCTAGGCTT
TTGCAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAA
GATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCT
ATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTG
TCAGCGCAGGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCT
GAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGC
GTTCTTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGC
TGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCT
GCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGA
TCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCAC
GTAATCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCA
TCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCC
GACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCAT
GGTGGAAAATGGCCGCTTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTG
GCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCT
TGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCG
ATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGA
CTCTGGGGTTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGAT
TTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCG
GGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTC
GCCACCCCTAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAG
GAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTGGG
TCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTGATAC
CCCACCGAGACCCCATTTGGGGCCAATACGCCCGCGTTTCTTCTTTTCCCCAC
CCCACCCCCCAAGTTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGC
GGCAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAA
AACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCA
TGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTA
GAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTCTGCGCGTAATCTGCTG
CTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAG
AGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCA
AATACTGTCCTTCTAGTGATAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGT
AGCACCGCCTACATAACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCA
GTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGAT
AAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGG
AGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGC
GCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGG
TCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCT
TTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGAT
GCTCGTCAGGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTT
ACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTCCTGCGTTAT
CCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT

Fig. 5 Forts. 3

Komplette Sequenz von H1.0 mit Multiple Cloning Site (MCS) Anschluss für pSV-HIII-XFP:

MCS:

AGCTTCGAATTCTGCAGTCGACG

Sequenz H1.0:

ATGACCGAGAATTCCACGTCCGCCCTGCGGCCAAGCCCAAGCGGGCCAAGGCCTCCA
AGAAGTCCACAGACCACCCCAAGTATTCAGACATGATCGTGGCTGCCATCCAGGCCGAG
AAGAACCGCGCTGGCTCCTCGCGCCAGTCCATTCAGAAGTATATCAAGAGCCACTACAA
GGTGGGTGAGAACGCTGACTCGCAGATCAAGTTGTCCATCAAGCGCCTGGTCACCACCG
GTGTCCTCAAGCAGACCAAAGGGGTGGGGGCCTCGGGGTCCTTCCGGCTAGCCAAGAG
CGACGAACCCAAGAAGTCAGTGGCCTTCAAGAAGACCAAGAAGGAAATCAAGAAGGT
AGCCACGCCAAAGAAGGCATCCAAGCCCAAGAAGGCTGCCTCCAAAGCCCCAACCAAG
AAACCCAAAGCCACCCCGGTCAAGAAGGCCAAGAAGAAGCTGGCTGCCACGCCCAAG
AAAGCCAAAAAACCAAGACTGTCAAAGCCAAGCCGGTCAAGGCATCCAAGCCCAAA
AAGGCCAAACCAGTGAAACCCAAAGCAAAGTCCAGTGCCAAGAGGGCCGGCAAGAAG
AAG

MCS:

CGGGATCCACCGGTCGCCACC

Komplette Sequenz von H2A.1 mit Multiple Cloning Site (MCS) Anschluss für pSV-HIII-XFP:

MCS:

AAGCTTCGAATTCTG

Sequenz H2A.1:

ATGTCGGGACGCGGCAAGCAGGGAGGCAAAGCTCGCGCCAAAGCCAAGACCCGCTCT
TCTCGTGCCGGTCTCCAGTTCCCCGTGGGGCCGAGTGCACCGACTGCTCCGCAAGGGCA
ACTATGCTGAGCGGGTCGGGGCCGGCGCGCCGGTGTACCTGGCGGGCGGTGCTGGAGT
ACCTGACTGCCGAGATCCTGGAGCTGGCGGGCAACGCCGCCCGCGACAACAAGAAGA
CCCGCATTATCCCGCGCCACTTGCAGCTGGCCATCCGCAACGACGAGGAGCTCAACAA
GCTGCTGGGCAAAGTAACCATCGCTCAGGGTGGTGTCTGCCCAACATCCAGGCTGTG
CTACTGCCCAAGAAGACCGAGAGTCACCACAAGGCCAAAGGCAAA

MCS:

CGGGATCCACCGGTCGCCACC

Komplette Sequenz von H2B.a mit Multiple Cloning Site (MCS) Anschluss für pSV-HIII-XFP:

MCS:

AAGCTTCGAATTCTG

Sequenz H2B.a:

ATGCCTGAACCAGCTAAGTCAGCTCCTGCTCCGAAGAAGGGTTCCAAGAAGGCTGTG
ACCAAGGCGCAGAAGAAGGATGGCAAGAAGCGCAAGCGCAGTCGTAAGGAGAGCTA

CTCCGTGTATGTGTACAAGGTGCTAA~~AA~~CAGGTT~~C~~ACCC~~C~~GATACTGGCATCTCATCC
AAGGCCATGGGCATCATGAATTCCTTCGTTAACGACATCTTCGAACGCATCGCAGGCG
AGGCTTCCCGTCTGGCCCACTACAACAAGCGCTCGACCATTACCTCCAGGGAGATCCA
GACCGCCGTGCGTCTGCTGCTTCCCGGAGAGCTGGCCAAGCACGCAGTGTCCGAAGGT
ACCAAGGCTGTCACCAAGTATACAAGCTCCAAG

MCS:

• CGGGATCCACCGGTCGCCACC

Komplette Sequenz von H3.1 mit Multiple Cloning Site (MCS) Anschluss für pSV-HIII-XFP:

MCS:

AAGCTTCGAATTCTG

Sequenz H3.1:

ATGGCTCGTACGAAGCAAACAGCTCGCAAGTCTACCGGCGGCAAAGCTCCGCGCAAG
CAGCTTGCTACTAAAGCAGCCCGTAAGAGCGCTCCGGCCACCGGTGGCGTGAAGAAA
CCTCATCGCTACCGCCCCGGGCACCGTGCCCTTGCGCGAAATCCGTCGCTACCAGAAGT
CCACCGAGCTGCTGATCCGGAAGCTGCCGTTCCAGCGCCTGGTGCGAGAAATCGCCCA
GGACTTCAAACCGACCTGCGTTTCCAGAGCTCTGCGGTGATGGCGCTGCAGGAGGCT
TGCGAGGCCTACCTGGTGGGACTCTTCGAAGACACCAATCTGTGCGCTATTACGCTA
AACGCGTCACCATCATGCCCAAAGATATCCAGCTGGCACGTCGCATCCGTGGGGAAA
GGGCA

MCS:

CGGGATCCACCGGTCGCCACC

Komplette Sequenz von H4.a mit Multiple Cloning Site (MCS) Anschluss für pSV-HIII-XFP:

MCS:

AAGCTTCGAATTCTG

Sequenz H4.a:

ATGTCCTGGACGTGGTAAGGGCGGGAAGGGTTTGGGTAAGGGGGGTGCCAAGCGCCACC
GCAAGGTGTTGCGTGACAACATCCAGGGCATACCAAGCCGGCCATCCGGCGTCTGGCC
CGGCGTGGCGGTGTGAAGCGGATCTCTGGTCTGATCTACGAGGAGACTCCGGGGGTGCT
CAAGGTGTTTTTGGAGAACGTGATCCGTGACGCTGTACCTATACGGAGCACGCCAAGC
GCAAGACAGTCACTGCCATGGACGTGGTCTACGCGCTTAAGCGCCAGGGACGCACCTT
TATGGCTTTGGCGGT

MCS:

CGGGATCCACCGGTCGCCACC

Komplette Sequenz von mH2A1.2 mit Multiple Cloning Site (MCS) Anschluss für pSV-HIII-XFP:

MCS:

AAGCTTCGAATTCTG

Sequenz mH2A1.2:

Fig. 5 Forts. 4

ATGTCGAGCCGCGGTGGGAAGAAGAAGTCCACCAAGACGTCCAGGTCTGCCAAAGCA
GGAGTCATCTTTCCCGTGGGGCGGATGCTGCGGTACATCAAGAAAGGCCACCCCAAG
TACAGGATTGGAGTGGGGGCACCCGTGTACATGGCCGCGTCCTGGAATACCTGACA
GCGGAGATTCTGGAGCTGGCTGGCAATGCAGCGAGAGACAACAAGAAGGGACGGGT
CACACCCCGGCACATCCTGCTGGCTGTGGCCAATGATGAAGAGCTGAATCAGCTGCTA
AAAGGAGTCACCATAGCCAGTGGGGGTGTGTTACCCAACATCCACCCCGAGTTGCTA
GCGAAGAAGCGGGGATCCAAAGGAAAGTTGGAAGCCATCATCACACCACCCCGAGCC
AAAAAGGCCAAGTCTCCATCCCAGAAGAAGCCTGTATCTAAAAAAGCAGGAGGCAAG
AAAGGGGCCCCGGAATCCAAGAAGAAGCAGGGTGAAGTCAGTAAGGCAGCCAGCGC
CGACAGCACAAACCGAGGGCACACCTGCCGACGGCTTCACAGTCCTCTCCACCAAGAGC
CTCTTCCTTGGCCAGAAGCTGAACCTTATTACAGTGAAATCAGTAATTTAGCCGGCT
TTGAGGTGGAGGCCATAATCAATCCTACCAATGCTGACATTGACCTTAAAGATGACCT
AGGAAACACGCTGGAGAAGAAAGGTGGCAAGGAGTTTGTGGAAGCTGTCCTGGAAC
TCCGGAAAAAGAACGGGGCCCTTGGAAGTAGCTGGAGCTGCTGTCAGCGCAGGCCATG
GCCTGCCTGCCAAGTTTGTGATCCACTGTAATAGTCCAGTTTGGGGTGCAGACAAGTG
TGAAGAACTTCTGGAAAAGACAGTGAAAAACTGCTTGGCCCTGGCTGATGATAAGAA
GCTGAAATCCATTGCATTTCCATCCATCGGCAGCGGCAGGAACGGTTTTCCAAAGCAG
ACAGCAGCTCAGCTGATTCTGAAGGCCATCTCCAGTTACTTCGTGTCTACAATGTCCT
CTTCCATCAAAACGGTGTACTTCGTGCTTTTTGACAGCGAGAGTATAGGCATCTATGT
GCAGGAAATGGCCAAGCTGGACGCCAAC

MCS:

CAGTCGACGGTACCGCGGGCCCCGGGATCCACCGGTCGCCACC

Fig. 5 Forts. 5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)